

УДК 581.181+577.112+577.152.1

Л. В. Шупранова, В. С. Більчук, А. М. Місюра

Дніпропетровський національний університет

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПРОРОСТКІВ *RAPHANUS SATIVUS* ПРИ ПРОРОЩУВАННІ НА ВОДНИХ ВИТЯЖКАХ ІЗ ҐРУНТІВ ТЕХНОГЕННИХ ТЕРИТОРІЙ

Досліджено вплив забруднення ґрунтів на функціональний стан проростків редиски. Показано, що мінливість хімічного складу ґрунтів із різних техногенних зон викликає активну перебудову білкової системи, а також системи антиоксидантного захисту клітини від надлишкового накопичення важких металів у ґрунті.

The soil pollution influence on functional state of the garden radish seedlings is studied. It has been shown that the variability of soil's mineral composition from different technogenic zones entails active reorganization in a protein system and in antioxidant cell protection from the heavy metals superfluous accumulation in soil as well.

Вступ

Один із видів антропогенного впливу на агроценози – надходження до ґрунту та нагромадження в рослинах важких металів [3; 4; 7]. Техногенні полютанти порушують структури клітин, фізіологічні процеси та метаболізм рослин, що створює небезпеку для нормального функціонування екосистем [5].

Для прийняття обґрунтованих рішень у природоохоронній діяльності проводять діагностику забруднення довкілля важкими металами з використанням широкого кола рослин [2; 7; 9]. Один із швидких методів біотестування навколишнього середовища – вирощування рослинних тест-об'єктів на водних витяжках ґрунтів, відібраних із різних за рівнем забруднення техногенних зон. У зв'язку з цим мета даної роботи – оцінити вплив токсичних інгредієнтів ґрунтів, відібраних поблизу територій підприємств хімічного та металургійного виробництва, теплоелектростанції м. Дніпропетровськ, на функціональний стан проростків *Raphanus sativus* L.

Матеріал і методи досліджень

У роботі використані 4-добові проростки редиски (*Raphanus sativus* L.). Насіння пророщували на водних витяжках ґрунтів техногенних зон міста. Ґрунт відбирали поблизу (50 м – діл. 1, 100 м – діл. 2, 150 м – діл. 3) територій ЗАТ Лакофарбовий завод (ЛФЗ), ВАТ Дніпрошина (ДШ), Металургійного заводу ім. Петровського (МЗП), Придніпровської теплової електростанції (ПТЕС) і на території Ботанічного саду Дніпропетровського національного університету (БС). Визначення вмісту важких металів проводили на атомно-абсорбційному спектрофотометрі ААС-30.

Легкорозчинні білки колеоптилів 4-добових проростків редиски, вилучені 0,05 М трис-*HCl* буфером, *pH* 7,4, фракціонували SDS-електрофорезом у градієнті ПААГ 7,5–15 % за методом Леммлі [12]. Визначення кількості білка в екстракті проводили за методом Бредфорд [11]. Активність пероксидази визначали одразу після виділення, розраховували її за методом Бояркіна [1]. Статистичну обробку проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики [8].

© Л. В. Шупранова, В. С. Більчук, А. М. Місюра, 2006

Результати та їх обговорення

Проведені дослідження виявили нерівномірність забруднення ґрунтів важкими металами (табл. 1). В усіх вивчених ґрунтах встановлена підвищена кількість міді, цинку та нікелю, тільки вміст заліза та марганцю не перевищував рівня ГДК. Найбільша кількість кадмію виявлена поблизу території ВАТ Дніпрошина (1,1 і 7,4 мг/кг), Ботанічного саду (1,2 мг/кг), а свинцю – ЛФЗ (діл. 2 – 270,7 мг/кг) і МПЗ (діл. 2 – 101,1 мг/кг). Попередні дослідження показали, що ґрунти поблизу територій промислових підприємств мають середню забезпеченість рухомими формами фосфатів і низький вміст азоту та калію [10].

Таблиця 1

Вміст важких металів у ґрунтах, відібраних із різних промислових зон м. Дніпропетровськ

Район відбору		<i>Fe</i>	<i>Mn</i>	<i>Cu</i>	<i>Zn</i>	<i>Ni</i>	<i>Pb</i>	<i>Cd</i>
Ботанічний сад ДНУ		1001,60	86,97	16,4	219,45	20,03	27,43	1,17
ЛФЗ	діл. 1	1035,60	82,15	4,99	78,07	30,86	4,23	0,75
	діл. 2	1017,52	112,94	9,11	413,09	25,76	270,71	0,77
	діл. 3	1107,27	120,16	18,21	298,33	20,08	19,74	0,56
ДШ	діл. 1	985,22	126,27	4,90	124,92	35,64	9,73	1,08
	діл. 2	1140,74	125,12	33,21	544,88	130,22	33,41	7,39
	діл. 3	680,14	106,24	4,70	92,46	33,57	6,06	0,98
ПТЕС	діл. 2	243,12	72,55	3,96	62,11	28,83	2,85	0,45
	діл. 3	1015,87	114,13	12,93	225,29	24,66	15,47	1,05
МЗП	діл. 2	332,82	123,63	10,74	201,24	21,17	101,14	0,92
	діл. 3	409,64	86,51	2,99	3,16	21,84	4,33	0,58

Токсичні компоненти ґрунту впливають на метаболізм проростків редиски, що проявилось у зниженні акумуляції білка в коренях і колеоптилях порівняно з умовним контролем (БС) (табл. 2). Нерівномірність забруднення ґрунтів важкими металами обумовила різний ступінь зниження рівня білків.

Рослини, що зростали на водних витяжках ґрунту ЛФЗ, показали гальмування процесу акумуляції білка в колеоптилях від 11,4 до 50,6 %, ПТЕС – 17,9–33,6 %, на ділянках 1 і 2 ВАТ Дніпрошина – 27,5–38,9 % відповідно. У колеоптилів проростків варіанта МЗП виявлено тенденцію до зниження вмісту білка, тоді як у корінні цей показник достовірно зменшувався (від 26,2 до 43,7 %). Найбільші коливання вмісту білків у корінні зареєстровані для варіанта дослідів ДШ на діл. 2 і 3, де відбувалося зниження накопичення білків на 70 і 5 % відповідно. В інших дослідних зразках зменшення кількості білків у корінні варіювало в межах від 12,5 до 50 %.

Пониження інтенсивності білкового синтезу має свій фізіологічний сенс, оскільки може сприяти збереженню самого білоксинтезуючого апарату на стадії трансляції, зменшувати енергетичне навантаження на клітину та знижувати ймовірність метаболічного самопошкодження клітин.

Пригнічення білкового синтезу за несприятливих умов може супроводжуватися синтезом стресових білків, функції яких дуже різноманітні: участь у захисті рослинних клітин від пошкоджень, підвищення стабільності інших молекул із збереженням їх функціональної активності, заміна нестабільних білків та участь у процесах репарації [6]. У зв'язку з цим становило інтерес дослідження зміни поліпептидного складу білків за умов різного вмісту та співвідношення важких металів у ґрунтах.

Електрофоретичний (ЕФ) аналіз легкорозчинних білків колеоптилів проростків редиски показав, що всі досліджені зразки виявили значне різноманіття спектрів білків за складом та інтенсивністю накопичення окремих компонентів (табл. 3).

У складі цитоплазматичних білків колеоптилів редиски варіанта БС виявлено 12 поліпептидів із молекулярною масою 19,5–80,8 кДа. Домінували компоненти з низькою (19,5–20,6 кДа) та середньою молекулярною масою (30,6, 33,2, 49,5 кДа).

Таблиця 2

Концентрація легкорозчинних білків проростків редиски, вирощених на водних витяжках ґрунту з різних промислових зон м. Дніпропетровськ

Район відбору проб		Концентрація білка, мг/мл			
		Колеоптилі	С, %	Коріння	С, %
Ботанічний сад ДНУ		3,24 ± 0,16	–	0,80 ± 0,004	–
ЛФЗ	діл. 1	1,60 ± 0,06	49,4	0,40 ± 0,024	50,0
	діл. 2	2,87 ± 0,17	88,6	0,70 ± 0,049	87,5
	діл. 3	2,60 ± 0,13	80,2	0,60 ± 0,024	75,0
ДШ	діл. 1	2,35 ± 0,16	72,5	0,24 ± 0,012	30,0
	діл. 2	1,98 ± 0,09	61,1	0,36 ± 0,022	45,0
	діл. 3	3,16 ± 0,22	97,5	0,76 ± 0,053	95,0
ПТЕС	діл. 1	2,66 ± 0,11	82,1	0,70 ± 0,028	87,5
	діл. 2	2,15 ± 0,13	66,4	0,74 ± 0,052	92,5
	діл. 3	2,50 ± 0,12	77,2	0,68 ± 0,034	85,0
МЗП	діл. 1	3,12 ± 0,16	96,3	0,59 ± 0,035	73,8
	діл. 2	3,20 ± 0,13	98,8	0,45 ± 0,023	56,3
	діл. 3	3,10 ± 0,19	95,7	0,59 ± 0,024	73,8

Примітка: С – відсоток до контролю.

Таблиця 3

Компонентний склад легкорозчинних білків колеоптилів проростків редиски, вирощених на водних витяжках ґрунту з різних промислових зон м. Дніпропетровськ

M _r , кДа	БС	ЛФЗ			ДШ			ПТЕС		МЗП		
		1	2	3	1	2	3	1	3	1	2	3
91,2	–	–	–	–	+	++	++	–	–	–	–	–
87,9	–	–	–	–	–	–	–	+	сл.	–	–	–
80,8	+	сл.	–	–	+	+	++	++	+++	сл.	–	–
76,0	+	+	–	–	+++	+++	++	–	–	–	–	–
72,5	сл.	–	–	+	–	–	–	+++	+++	+	+	+
65,3	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	++	+++
61,3	+	++	–	–	+++	+++	+++	++	+	сл.	–	–
57,8	+	–	сл.	+	–	–	–	–	–	–	++	++
52,6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
49,5	++	–	сл.	+++	–	–	–	++	+	+	+	++
43,7	сл.	+++	–	–	++	+	+++	–	–	–	–	–
35,3	–	–	–	–	++	+++	++	–	–	–	–	–
33,2	+++	–	+	сл.	–	–	–	+++	+++	++	++	+++
30,6	++	–	–	++	–	–	–	+++	++	++	+	++
27,9	–	–	–	–	++	++	++	–	–	–	–	–
21,3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+++	–	–
20,6	+++	++	–	–	+++	+++	+++	–	–	–	–	–
19,5	++	–	+	сл.	–	–	–	+++	+++	–	+	+
18,4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+++	–	–
15,7	–	–	–	–	++	+	++	–	–	–	–	–
13,2	–	–	–	–	+	+	++	+	+	+++	сл.	+

Примітки: – – відсутність компонента; сл. – сліди; + – слабе, ++ – середнє, +++ – сильне накопичення компонента.

У варіанті з полікомпонентними викидами ЛФЗ на ґрунт усі зразки редиски виявили різний поліпептидний склад. Порівняно з умовним контролем для зразка діл. 1 характерне суттєве пригнічення акумуляції семи поліпептидів, а також підвищення експресії двох поліпептидів з M_r 43,7 та 61,3 кДа. Компонентний склад зразка діл. 2 характеризувався загальним пригніченням синтезу білка аж до повного зникнення ряду компонентів. Для зразка діл. 3 характерне зникнення чотирьох компонентів та підвищення накопичення поліпептидів з M_r 49,5 та 72,5 кДа.

Для варіантів проростків редиски, які вирощували на водних витяжках із ґрунтів ПТЕС (діл. 1, 3) спостерігали появу двох поліпептидів – з M_r 13,2 і 87,9 кДа, зникнення п'яти та підвищення інтенсивності накопичення трьох (для зразка діл. 1) і п'яти компонентів (для зразка діл. 3).

Компонентний склад цитоплазматичних білків у всіх варіантах дії токсикантів ДШ характеризувався появою поліпептидів із низькою (13,2 та 15,7 кДа), середньою (27,9 та 35,3 кДа) та високою молекулярними масами (91,2 кДа). Виявлено підвищення вмісту білка у поліпептидів з M_r 43,7, 61,3 та 76,0 кДа. Зареєстровано повне зникнення семи компонентів. Для варіантів МЗП встановлено всі види змін у білковій системі: зникнення або поява поліпептидів, зменшення чи підвищення вмісту білка в ЕФ зонах.

Таким чином, характер перебудови білкової системи відрізняється в усіх варіантах досліджу, але для певних типів ґрунту простежується загальна тенденція. Для рослин, що зростали на витяжках ґрунту ЛФЗ, характерне зникнення значної кількості (8) поліпептидів або зменшення інтенсивності накопичення інших. Вплив інгредієнтів ґрунтів ДШ, ПТЕС і МЗП на компонентний склад легкорозчинних білків виявився складнішим: окрім зниження інтенсивності акумуляції білка, з'явилися поліпептиди, не характерні для умовного контролю.

Кожний варіант досліджу характеризується своїм складом нових білків. Усі зразки досліджу ДШ виявили появу п'яти компонентів, ПТЕС – двох, а МЗП – двох або трьох. Для більшості варіантів досліджу, окрім ЛФЗ, зареєстрований низькомолекулярний поліпептид 13,2 кДа. Інтенсивність накопичення одних і тих самих поліпептидів різна, що свідчить про зміни експресії відповідних генів залежно від умов пророщування насіння. Інтенсивність накопичення поліпептиду 61,3 кДа у різних зразках ґрунту ЛФЗ значно змінювалася: від підвищення його вмісту у складі білкової системи до повного зникнення. Дія токсикантів на склад легкорозчинних білків ДШ і ПТЕС призвела до накопичення поліпептиду 61,3 кДа, а МЗП – до зменшення кількості або його повного зникнення.

Одна з найважливіших рис метал-індукованої трансформації метаболізму клітин – зміна активності ферментів антиоксидантного захисту. У наших дослідженнях активність пероксидази, визначена в корінні та колеоптилях проростків редиски, значно варіює між дослідними зразками та в межах одного варіанта, що обумовлено неоднорідністю вивчених ґрунтів (табл. 4). У межах варіантів ЛФЗ і ПТЕС виявлено як підвищення, так і зниження питомої активності пероксидази. Для ґрунтів ВАТ Дніпрошина характерне підвищення активності ферменту у коренях (на 16,3–107,0 %). Таким чином, підвищення активності ензиму можна розглядати як прояв захисної реакції рослин в умовах забрудненого середовища.

Для коріння проростків редиски варіанта МЗП характерне зниження активності пероксидази від 24,7 до 27,8 %. У цілому у більшості випадків у корінні встановлено зниження питомої активності ферменту на 7,4–28,1 % порівняно з умовним контролем. Аналогічна залежність виявлена і для колеоптилів редиски в умовах дії токсикантів із ґрунтів ЛФЗ (діл. 2, 3). Пригнічення активності пероксидази свідчить

про значний токсичний вплив ксенобіотиків на коріння проростків. Що стосується колеоптилів, то практично в усіх зразків виявлено підвищення активності пероксидази на 4,2–401,2 %.

Таблиця 4

Питома активність пероксидази проростків редиски, вирощених на водних витяжках ґрунту з різних промислових зон м. Дніпропетровськ

Район відбору		Коріння		Колеоптилі	
		ПА, $\Delta\epsilon/\text{мг}\cdot\text{с}^{-1}$	С, %	ПА, $\Delta\epsilon/\text{мг}\cdot\text{с}^{-1}$	С, %
Ботанічний сад ДНУ		$24,25 \pm 1,32$	–	$3,06 \pm 0,26$	–
ЛФЗ	діл. 1	$26,13 \pm 0,72$	107,7	$3,10 \pm 0,03$	100,2
	діл. 2	$18,25 \pm 0,94$	75,3	$8,77 \pm 0,20$	287,1
	діл. 3	$21,29 \pm 1,59$	87,8	$2,24 \pm 0,24$	73,3
ДШ	діл. 1	$50,21 \pm 5,53$	207,0	$7,36 \pm 0,13$	240,9
	діл. 2	$40,21 \pm 0,55$	165,8	$15,32 \pm 0,39$	501,2
	діл. 3	$28,19 \pm 1,34$	116,3	$14,94 \pm 0,06$	488,8
ПТЕС	діл. 1	$17,43 \pm 0,16$	71,9	$4,62 \pm 0,19$	151,0
	діл. 2	$37,13 \pm 5,17$	153,1	$10,57 \pm 0,71$	345,9
	діл. 3	$22,46 \pm 2,68$	92,6	$8,02 \pm 0,19$	262,5
МЗП	діл. 1	$17,50 \pm 0,74$	72,2	$6,84 \pm 0,20$	223,8
	діл. 2	$23,94 \pm 1,93$	98,7	$7,73 \pm 1,45$	253,1
	діл. 3	$18,26 \pm 0,49$	75,3	$3,21 \pm 0,52$	104,9

Висновок

Мінливість мінерального складу середовища знайшла своє відображення у відповідній варіабельності різних обмінних процесів клітини, що включає в себе зниження інтенсивності загального білкового синтезу, формування різного за складом та інтенсивністю пулу легкорозчинних цитоплазматичних білків, зміну активності системи антиоксидантного захисту.

Бібліографічні посилання

1. Бояркин А. Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы // Биохимия. – 1951. – Т. 16. – С. 352–355.
2. Важенни И. Г. Корни растений как биоиндикатор уровня загрязненности почвы токсическими элементами // Агрохимия. – 1984. – № 2. – С. 73–77.
3. Гармаш Г. А. Тяжелые металлы в огородных культурах и почвах // Агрохимия. – 1984. – № 3. – С. 71–75.
4. Гуральчук Ж. З. Надходження та детоксикація важких металів у рослинах // Живлення рослин: теорія та практика. – К.: Логос, 2005. – С. 438–475.
5. Княк Н. Я. Фізіолого-біохімічні механізми адаптації епіфітного моху *Leskea polycarpa* до токсичної дії важких металів // Живлення рослин: теорія і практика. – К.: Логос, 2005. – С. 509–519.
6. Колупасв Ю. Є. Стресові реакції рослин (молекулярно-клітинний рівень) / Харківський держ. аграрн. ун-т. – Харків, 2001. – 173 с.
7. Коршиков И. И. Взаимодействие растений с техногенно загрязненной средой / И. И. Коршиков, В. С. Котов, И. П. Михеенко и др. – К.: Наукова думка, 1995. – 192 с.
8. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
9. Лихолат Ю. В. Використання дерноутворюючих трав для діагностики рівня забруднення навколишнього середовища важкими металами / Ю. В. Лихолат, І. П. Григорюк // Доповіді НАНУ. – 2005. – № 8. – С. 196–207.

10. **Шупранова Л. В.** Исследование ростовых процессов растений редиса при выращивании на водных вытяжках почв из разных по уровню загрязнения тяжелыми металлами техногенных территорий / Л. В. Шупранова, В. С. Бильчук // Геоэкологические проблемы загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами. Матер. I Междунар. геоэкологической конф. – 2003. – С. 486–488.
11. **Bradford M. M.** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – P. 248–254.
12. **Laemmli U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, N 52–59. – P. 680.

Надійшла до редколегії 12.03.06.